



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112010963 B

(45) 授权公告日 2022.05.20

(21) 申请号 202010703516.8

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.20

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112010963 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2020.12.01

CN 111303280 A, 2020.06.19

CN 111423508 A, 2020.07.17

(73) 专利权人 江苏集萃医学免疫技术研究所有限公司

CN 111153991 A, 2020.05.15

Zhou G等.Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2.《International journal of biological sciences》.2020,第16卷(第10期),

地址 210000 江苏省南京市江北新区新锦湖路3-1号中丹生态生命科学产业园一期A座947-5室

Klasse PJ.Antibodies to SARS-CoV-2 and their potential for therapeutic passive immunization.《Elife》.2020,

(72) 发明人 俞逢佳 牛学峰 李松 陈凌

审查员 周韵品

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

专利代理师 张莹

权利要求书1页 说明书23页

序列表31页 附图7页

(51) Int.Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

(54) 发明名称

SARS-COV-2抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及SARS-COV-2抗体及其用途。本发明提供分离的或非天然存在的SARS-CoV-2单克隆抗体,其包含含有选自SEQ ID NOS:1-17的氨基酸序列的轻链可变区和含有选自SEQ ID NOS:18-26的氨基酸序列的重链可变区。本发明还涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,该抗体包含含有选自SEQ ID NOS:18-76的氨基酸序列的重链可变区。本发明的抗体可作为治疗COVID-19的治疗剂或作为评估受试者中COVID-19感染的诊断工具。

1. 一种分离的或非天然存在的抗体,其包含:
  - (a) Kabat编号表示的SEQ ID NOS:81-83中所示的重链CDR1、CDR2、和CDR3,和(b) Kabat编号表示的SEQ ID NOS:84-86中所示的轻链CDR1、CDR2、和CDR3,其中所述抗体特异性结合SARS-CoV-2的NP蛋白。
2. 权利要求1所述的抗体,其包含:
  - (a) SEQ ID NO:78中所示的重链中的重链可变区,和(b) SEQ ID NO:80中所示的轻链中的轻链可变区。
3. 权利要求1所述的抗体,其包含:
  - (a) SEQ ID NO:78中所示的重链,和(b) SEQ ID NO:80中所示的轻链。
4. 权利要求1-3任一项所述的抗体,其是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 或Fv片段。
5. 一种编码权利要求1-4任一项的抗体的核酸。
6. 一种表达权利要求1-4任一项的抗体的永生化B细胞克隆。
7. 一种包含权利要求1-4任一项的抗体的诊断组合物。
8. 权利要求1-4任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于检测生物样品中SARS-CoV-2病毒存在的检测剂或用于诊断COVID-19的诊断剂中的用途,其中所述抗原结合片段为Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 或Fv片段。

## SARS-CoV-2抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及病毒抗体及其用途,尤其涉及SARS-CoV-2单克隆抗体及其医学用途。

### 背景技术

[0002] 2019年报告了严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)引起的冠状病毒病(coronavirus disease-19, COVID-19)。该病毒与2003年的SARS-CoV高度相关。该病毒主要影响肺部,但也会影响肾、肝、脑、胃肠道等多个器官。病毒通过呼吸道飞沫、尿液和粪便传播。SARS-CoV-2的临床症状包括发热、咳嗽、呼吸急促,无其他病原体,胸部CT影像学检查以双侧玻璃状不透明为特征的肺炎。大部分COVID-19患者表现为轻度或中度综合征,经适当的临床护理后即可恢复,而部分COVID-19患者则迅速出现重症肺炎和多器官功能衰竭。

[0003] 目前,对于宿主SARS-CoV-2感染的免疫应答机制仍没有深刻理解。SARS-CoV-2感染患者以及SARS-CoV患者和中东呼吸综合征(MERS)患者普遍存在淋巴细胞减少。有研究观察到,在严重的COVID-19病例中,总T细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>亚型T细胞的数量急剧减少,而程序性死亡配体1(PD-1)和T细胞免疫球蛋白粘蛋白3(Tim-3)增加,表明T细胞已经衰竭。一些研究者建议监测淋巴细胞比例动态,作为预测COVID-19严重程度的指标。有合并症的老年COVID-19患者发生严重肺炎和死亡的风险较高。老年患者T细胞和B细胞功能缺陷可能导致清除病毒的能力不足和长期的促炎反应。

[0004] 目前尚无疫苗可用于预防COVID-19。因此,需要鉴定和生产对SARS-CoV-2有效的特异性结合抗体和中和抗体,以及阐明抗体所结合的靶标和抗原决定簇。

### 发明内容

[0005] 本文已经通过外周血T细胞受体和B细胞受体组库分析揭示了COVID-19患者中动态的适应性免疫应答。在一些实施方案中,为了解在系统水平上的T细胞和B细胞免疫应答,发明人使用下一代测序来分析不同COVID-19疾病阶段的患者的T细胞受体(TCR)和B细胞受体(BCR)组库。在患者发病早期和恢复过程中的适应性免疫应答以全景可视化方式呈现。TCR组库在严重疾病的早期发病时有急剧减少,但在恢复阶段得到恢复。在一些实施方案中,监测TCR组库可以作为预测疾病进展的指示性生物标志物。BCR组库具有IgM到IgG的同种型转换和一过性的显著的IgA扩增。感染后发生主导性B细胞克隆扩增,并伴有多样性降低。本文的研究表明免疫组库分析是评价宿主对新型病毒感染免疫力的有前途的方法。在一些实施方案中,通过BCRs和TCRs的NGS用于免疫组库分析,可以对SARS-CoV-2感染后免疫应答进行整体观察。在一些实施方案中,已经发现TCR组库在重症时急剧下降,但在恢复阶段得到恢复。在一些实施方案中,已经发现发病后BCR组库显示主导性克隆扩增与IgM/IgG同种型切换和短暂的IgA激增。

[0006] 在一些实施方案中,本发明涉及能够与一个或多个SARS-CoV-2表位结合的分离的或非天然存在的单克隆抗体。在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的

单克隆抗体,其包含:轻链可变区,其包含选自SEQ ID NOS:1-17的氨基酸序列;以及重链可变区,其包含选自SEQ ID NOS:18-26的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:轻链可变区,其包含选自SEQ ID NOS:1-4的氨基酸序列;以及重链可变区,其含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的轻链可变区;和含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区。

[0009] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:包含选自SEQ ID NOS:6-8的氨基酸序列的轻链可变区;以及含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链可变区。

[0010] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;和含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区。

[0011] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链可变区。

[0012] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:包含选自SEQ ID NOS:11-12的氨基酸序列的轻链可变区;以及含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区。

[0013] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链可变区;和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链可变区。

[0014] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区;以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区。

[0015] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:包含选自SEQ ID NOS:15-17的氨基酸序列的轻链可变区;以及含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变区。

[0016] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,该抗体包含含有选自SEQ ID NOS:18-76的氨基酸序列的重链可变区。

[0017] 在一些实施方案中,本发明涉及一种分离的或非天然存在的单克隆抗体,其包含:

[0018] (a) Kabat编号表示的与SEQ ID NOS:78中所示的重链CDR1、CDR2、和CDR3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链CDR1、CDR2、和CDR3,和(b) Kabat编号表示的与SEQ ID NOS:80中所示的轻链CDR1、CDR2、CDR3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链CDR1、CDR2、CDR3;

[0019] (a) 与SEQ ID NOS:78中所示的重链可变区具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变区,和与SEQ ID NOS:80中所示

的轻链可变区具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变区；或

[0020] (a) 与SEQ ID NOS:78中所示的重链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链,和与SEQ ID NOS:80中所示的轻链具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链。

[0021] 在一些实施方案中,本发明包括与上述SEQ ID NOS所示的氨基酸序列相比具有一个或多个(优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸突变(优选保守突变,优选置换,插入或缺失)的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,本发明所述抗体以 $10^{-9}$  M或更小的KD结合SARS-CoV-2。在一些实施方案中,本发明所述抗体以 $10^{-10}$  M或更小的KD结合SARS-CoV-2。

[0023] 在一些实施方案中,本发明所述抗体可以是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或抗体片段(例如,具备抗体活性例如结合或抑制活性的片段)。在一些实施方案中,本发明抗体的抗原结合片段可以包括Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, 互补决定区(CDR)片段,单链抗体(例如, scFv), 双价抗体或结构域抗体。

[0024] 在一些实施方案中,本发明所述抗体或其片段可以特异性结合SARS-CoV-2,例如SARS-CoV-2的NP蛋白,例如SARS-CoV-2的Spike蛋白,例如SARS-CoV-2的Spike蛋白的RBD结构域,和/或抑制SARS-CoV-2的活性,例如抑制SARS-CoV-2的复制,例如抑制SARS-CoV-2与受体的结合,例如降低SARS-CoV-2的负荷。

[0025] 在一些实施方案中,本发明涉及一种编码本文描述的抗体的核酸。

[0026] 在一些实施方案中,本发明涉及包含任何上述抗体的组合物。在一些实施方案中,本发明涉及表达任何上述抗体的永生B细胞克隆。在一些实施方案中,本发明涉及包含任何上述抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,本发明涉及一种检测生物样品中COVID-19的方法,该方法包括将样品与抗体接触,其中该抗体是本发明的单克隆抗体或抗体片段,并确定SARS-CoV-2病毒的存在或不存在。在一些实施方案中,本发明涉及本文描述的抗体或其片段在制备用于检测生物样品中SARS-CoV-2病毒存在的检测剂或用于诊断COVID-19的诊断剂或用于治疗COVID-19的治疗剂中的用途。

[0027] 本发明涉及分离的或非天然存在的SARS-CoV-2单克隆抗体。特别是,本发明涉及一种分离的或非自然发生的单克隆抗体,其包含含有选自SEQ ID NOS:1-17的氨基酸序列的轻链可变区(见表1)和含有选自SEQ ID NOS:18-26的氨基酸序列的重链可变区(见表2)。本发明还涉及一种分离的或天然存在的单克隆抗体,其包含一个重链可变区,该重链可变区包含一个选自SEQ ID NOS:18-76的氨基酸序列(见表2)。

[0028] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,除了可能存在的少量天然发生的突变外,组成该群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原位点。此外,与多克隆抗体制剂不同的是,多克隆抗体制剂包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体,每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的优点在于它们可以不受其它抗体的污染而合成。修饰词“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法生产该抗体。例如,在本发明中有用的单克隆抗体可以通过Kohler等人首先描述的杂交瘤方法, Nature, 256:495 (1975), 或通过使用细菌、真核动物或植物细胞中的重组DNA方法(例如,见美国专利号4,816,567)来制备。“单克隆抗体”

也可以从噬菌体抗体库中分离出来。

[0029] 典型地,本文本发明的抗体是利用技术中可获得的载体和方法重组产生的,如下文进一步描述。此处公开的抗体也可以通过体外激活的B细胞产生(参见,例如,美国专利号5,567,610)。本文本发明的抗体也可以在转基因动物如小鼠中产生,这些动物在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下,能够产生人类抗体的全抗体库。例如,已经描述了在嵌合体 and 生殖系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的同种缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人类生殖系免疫球蛋白基因阵列转移到这种生殖系突变体小鼠中,导致在抗原攻击时产生人类抗体。参见,例如,Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);美国专利5,545,806、5,545,807、5,569,825和5,591,669;和WO 97/17852。这样的动物可以通过基因工程来产生包含本发明多肽的人抗体。

[0030] 本文所述抗体的“CDR”(“互补性决定区”,也称“高变区”或“HVR”)表示抗体可变区的在序列上高变和/或形成在结构上确定的环(“高变环”)和/或含有与抗原接触残基(“抗原接触点”)的每个区域。通常,抗体包含六个CDR;三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL(L1、L2、L3)中。如本领域技术人员已知的,CDR残基和其它残基(例如,FR残基)可以根据不同的编号系统进行编号。例如,可以根据IMGT编号系统,Kabat编号系统(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991))、Chothia和Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917(1987))等进行编号。如本领域技术人员所知,抗体的“框架”或“FR”表示除了高变区(HVR)残基之外的可变区残基。可变区的FR通常包括四个FR结构域:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常出现在VH(或VL)中的以下序列中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0031] 本文描述的“人抗体”可以包括氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体或源自利用人抗体组库或其它人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。本文描述的“人源化的”抗体可以包括来自非人CDR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。本文描述的“嵌合的”抗体表示其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,同时重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0032] 如本领域技术人员已知的,氨基酸序列同一性百分比(%)的比对可以以本领域技术中的多种方式实现,例如可以使用计算机程序ALIGN-2等进行氨基酸序列比对。在一些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列含有相对于参照序列的置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是保留原序列的活性,例如结合或抑制活性。可以通过本领域已知的任何方法测定抗体结合活性或抑制活性。

[0033] 可以根据极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或残基的两亲性的相似性对本发明的抗体进行氨基酸置换。例如,带负电荷的氨基酸包括天门冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值不带电极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;以及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。其他可代表保守变化的氨基酸组包括:(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2)cys、ser、tyr、thr;(3)val、ile、leu、met、ala、phe;(4)lys、arg、his;和(5)phe、tyr、trp、his。变体也可以或备选地包含非保守性变化。优选的是,变体多肽与原序列的差异在于5个或更少氨基酸的置换、缺失或添加。变体也可以或备选地通过缺失或添加对

多肽的免疫原性、二级结构和水溶性影响最小的氨基酸进行修饰。

[0034] 可以使用W02004/076677中描述的替代EBV永生化方法生成永生化B细胞克隆。用这种方法,产生本发明的抗体的B细胞可以在多克隆B细胞激活剂存在下用EBV转化。用EBV转化也可以被调整为包括多克隆B细胞激活剂。在转化步骤中可以加入额外的细胞生长和分化的刺激物,例如IL-2和IL-15,以提高效率。

[0035] 本发明还提供包含本发明多肽的抗体片段。在一些情况下,使用抗体片段而不是全抗体是有优势的。例如,片段的较小尺寸允许快速清除,并可能导致改善对一些组织的进入。对于描述本文中单克隆抗体的抗体片段的制备的所有实施例,筛选抗体片段以确保抗原结合没有被破坏。这可以通过本领域已知的各种手段中的任何一种来完成,例如使用噬菌体展示文库的方法。

[0036] 如本技术领域的技术人员所理解的,“抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区,并且保留与目标抗原结合活性的可接受百分比。如本领域技术人员理解的,可接受的百分比取决于特定的预期用途。抗体片段的例子包括例如单链抗体分子(例如,scFv)、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;单链抗体分子;由抗体片段形成的多特异性抗体;以及本领域技术人员已知的其它片段。“抗体片段”表示除了完整抗体以外的分子,所述分子包含完整抗体的一部分,所述部分结合所述完整抗体所结合的抗原。

[0037] 已知一些技术可用于生产抗体片段。尽管抗体片段传统上是完整抗体的蛋白分解消化得到的,但现在可以通过重组宿主细胞直接生产。例如,Fab、Fv和ScFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌中分泌,因此可以容易地大量生产这些片段。生产抗体片段的其它技术对于本领域的技术人员来说是已知的。

[0038] 上述抗体或其抗体片段中的任何一种可配制用于为怀疑患有或有可能患有COVID-19的受试者提供被动免疫的药物治疗剂,其包含治疗有效量的所述抗体。该药物制剂可包括合适的赋形剂或载体。如本领域的技术人员将理解的那样,总剂量可以根据受试者的体重、健康和情况以及抗体的疗效而变化。用于体内给药的制剂最好是无菌的,这可以通过例如将制剂通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0039] 如本文所使用的,“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所采用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物是无毒的。通常生理学上可接受的载体是pH缓冲的水溶液。生理学上可接受的载体的例子包括缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮。氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐平衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如TWEEN<sup>TM</sup>,聚乙二醇(PEG)和PLURONICS<sup>TM</sup>。

[0040] 被动免疫已被证明是预防和治疗病毒性疾病的有效和安全策略。因此,使用本文公开的抗体及其抗体片段的被动免疫可以提供COVID-19的治疗策略。

[0041] 在各种实施方案中,本文公开的抗体具有内在的治疗活性。另外,或此外,本文本发明的抗体可以与细胞毒性剂或生长抑制剂,如放射性同位素或毒素结合,用于治疗与抗体结合或接触的感染细胞。

[0042] COVID-19的高危受试者包括接触过感染者的患者,特别是那些有潜在健康问题的

患者,如糖尿病、心脏病或哮喘或COPD等呼吸系统疾病。在COVID-19的特征性症状表现之前,可以施用预防剂,从而防止COVID-19的发生或者延迟其发展。

[0043] 对于人和非人受试者的体内治疗,通常给受试者施用或提供包含至少一种本文公开的抗体的药物制剂。当用于体内治疗时,以治疗有效量向受试者施用本发明的抗体。如本文所用,“治疗有效量”是指消除或降低受试者病毒负荷的量。抗体可以按照已知的方法给人类受试者施用,例如静脉给药(作为栓剂或通过持续输注)或通过肌肉内、腹膜内、脑脊膜内、皮下、关节内、肌内、鞘内、鞘内、口服、局部或吸入途径施用。抗体可尽可能在靶细胞部位进行胃肠外给药,或静脉注射。在一些情况下,抗体的静脉或皮下给药是优选的。本发明的治疗组合物可对受试者进行全身、胃肠外或局部给药。

[0044] 对于胃肠外给药,本文本发明的抗体以单位剂量注射剂形式(溶液、悬浮液、乳剂)与药学上可接受的胃肠外载体联合配制。这类载体的例子是水、生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%人血清白蛋白。也可以使用非水性载体,如油和油酸乙酯。脂质体可作为载体使用。载体可以含有少量的添加剂,如增强等渗性和化学稳定性的物质,如缓冲剂和防腐剂。抗体可以以约1mg/ml至10mg/ml的浓度配制在这种载体中,也可以使用其它浓度。

[0045] 剂量和剂量方案可以根据医生容易确定的各种因素确定,如感染的性质和与抗体结合的特定细胞毒性剂或可任选使用的生长抑制剂的特性,如治疗指数和受试者的病史。一般来说,向受试者施用治疗有效量的抗体。在特定情况下,施用的抗体量在受试者体重的约0.1mg/kg至约50mg/kg的范围内。根据感染的类型和严重程度,约0.1mg/kg至约50mg/kg体重(约0.1-15mg/kg/剂量)的抗体是给受试者施用的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次单独施用,还是通过连续输注。这种治疗的进展容易通过常规方法并基于医生或本领域技术人员已知的标准进行监测。

[0046] 在一个特定的实施方案中,向受试者施用包含本文公开的与细胞毒性剂缀合的抗体的免疫缀合物。优选的是,免疫缀合物被细胞内化,导致免疫缀合物在杀灭其结合的细胞方面的治疗效果增加。在一个实施方案中,细胞毒性剂针对或干扰感染细胞中的核酸。这种细胞毒性剂的例子如上所述,包括但不限于美坦生类(maytansinoids)、刺孢霉素(calicheamicins)、核糖核酸酶和DNA内切酶。

[0047] 在一些实施方案中,可以将其他治疗方案与本发明的一种或多种SARS-CoV-2抗体的施用联合起来。联合给药包括联合给药,使用单独的制剂或单一的药物制剂,并以任一顺序连续给药,其中优选有一个时间段,而两种或所有活性剂同时发挥其生物活性。优选这种联合治疗可以获得协同治疗效果。

[0048] 在一些实施方案中,优选联合施用一种或多种本文公开的抗体。在一些实施方案中,最好将配置为与SARS-CoV-2相关的抗原结合的一种或多种抗体与一种或多种针对与SARS-CoV-2相关的不同抗原的其他抗体联合施用。

[0049] 除了向受试者施用该抗体外,本发明还提供了通过基因疗法施用该抗体的方法。本发明所述的“施用治疗有效量的抗体”包括施用编码抗体的核酸。例如,参见PCT专利申请公开W096/07321,其涉及使用基因疗法产生细胞内抗体。

[0050] 在另一个实施方案中,本文公开的SARS-CoV-2抗体用于确定结合抗原的结构,例如构象表位,其结构然后用于开发具有或模拟这种结构的疫苗,例如通过化学建模和SAR方法。这样的疫苗就可以用来预防COVID-19。



[0051] 在一些实施方案中,本发明提供用于检测具有选自SEQ ID NOS:1-17所示氨基酸序列的多肽或具有选自SEQ ID NOS:18-26所示氨基酸序列的多肽的试剂(如抗体)在制备用于检测生物样品中SARS-CoV-2病毒存在的检测剂或用于诊断COVID-19的诊断剂(组合物和试剂盒)中的用途。如本文中显示的,已经从COVID-19患者队列中获得了最大集群中最具影响力的序列,并列于表1和表2中。因此,在一些实施方案中,特异性检测到这些序列在患者中的存在可以指示患者的SARS-CoV-2病毒感染或患有COVID-19。特异性检测具有选自SEQ ID NOS:1-17所示氨基酸序列的多肽或具有选自SEQ ID NOS:18-26所示氨基酸序列的多肽的试剂可以通过本领域已知的方法制备,例如可以使用具备所述序列的多肽作为抗原免疫动物获得相应抗体如单克隆抗体。

[0052] 在一些实施方案中,本发明涉及用于检测来自受试者(例如怀疑感染SARS-CoV-2的受试者)的IgA的试剂(例如特异性结合IgA的抗体如单克隆抗体)在制备检测SARS-CoV-2感染的组合物或试剂盒中的用途。在一些实施方案中,所述组合物或试剂盒可以用于检测SARS-CoV-2的早期感染,例如感染后第4-7天(例如4、5、6、7天)的感染。在一些实施方案中,所述组合物或试剂盒还可以包括用于检测来自受试者的SARS-CoV-2的核酸、IgM和/或IgG的试剂(例如SARS-CoV-2特异性引物、IgM和/或IgG特异性抗体)。这样的试剂可以通过本领域已知的方法基于已经公开的SARS-CoV-2序列制备。

[0053] 在一些实施方案中,本发明涉及用于测定来自受试者(例如怀疑感染SARS-CoV-2的受试者)的T细胞受体(TCR)和B细胞受体(BCR)组库的试剂在制备用于监测COVID-19进程、用于预测COVID-19进展或预后分析的组合物或试剂盒中的用途。在一些实施方案中,测定来自受试者(例如怀疑感染SARS-CoV-2的受试者)的T细胞受体(TCR)和B细胞受体(BCR)组库的试剂可以包括用于进行NGS的试剂。在一些实施方案中,所述试剂可以用于分析TCR组库,已经发现TCR组库在严重疾病的早期发病时有急剧减少,但在恢复阶段得到恢复。因此,监测TCR组库可以作为预测疾病进展的指示性生物标志物。在一些实施方案中,所述试剂可以用于分析BCR组库,已经发现在病毒感染中BCR组库具有IgM到IgG的同种型转换和短暂的IgA激增,还发现感染后发生主导性B细胞克隆扩增,并伴有多样性降低。在一些实施方案中,所述免疫组库分析试剂可以用于评价宿主对新病毒感染的免疫力。

[0054] 在另一个实施方案中,本文公开的SARS-CoV-2抗体能够区分有COVID-19的受试者和没有COVID-19的受试者,并确定患者是否有感染。根据一种方法,从疑似感染或已知感染SARS-CoV-2的受试者获得生物样品。在优选的实施方案中,生物样品包括来自受试者的细胞。将样品与本文公开的SARS-CoV-2抗体接触一段时间并在足以使SARS-CoV-2抗体与存在于样品中的感染细胞结合的条件下进行。例如,可以将样品与SARS-CoV-2抗体接触10秒、30秒、1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、1小时、6小时、12小时、24小时、3天或两者之间的任何时间。测定结合的SARS-CoV-2抗体的量,并与对照值进行比较,对照值可以是预先确定的值或从正常组织样品中确定的值。与对照样品相比,与受试者样品结合的抗体量增加,表明受试者样品中存在感染的细胞。结合的抗体使用本文所述和本技术领域已知的程序进行检测。在一些实施例中,本发明的诊断方法使用本文公开的SARS-CoV-2抗体进行实践,该抗体与可检测的标签如荧光体结合,以促进结合抗体的检测。然而,它们也使用SARS-CoV-2抗体的二次检测方法来实践。这些方法包括,例如,RIA、ELISA、沉淀、凝集、补体固定和免疫荧光。

[0055] 在另一个实施方案中,本发明涉及适合于使用本发明的抗体进行诊断和预后检测

的试剂盒。本发明的试剂盒包括合适的容器,该容器包含以标记或未标记形式的本发明的 SARS-CoV-2 抗体。此外,当抗体以适合间接结合测定的标记形式提供时,试剂盒还包括用于进行适当的间接测定的试剂。例如,试剂盒包括一个或多个合适的容器,包括酶底物或衍生试剂。在一些实施方案中,还可以包括对照样品和/或说明书。

## 附图说明

[0056] 参照以下图示可以更好地理解公开的内容。

[0057] 图1.COVID-19患者不同疾病阶段的PBMC中的TCR-alpha (TRA), -beta (TRB), -delta (TRD), -gamma (TRG), BCR IgH, IgK, IgL。每个免疫链的比例在框图中以平均值+SD表示,饼图显示了每个链的平均值。来自COVID-19患者的样品分为三组:(A) 症状发作后4-7天的样品 (n=8); (B) 症状发作后8-15天的样品 (n=10); (C) 症状发作后17-22天的样品 (n=5); (D) 样品亚洲健康对照 (n=15)。

[0058] 图2.不同的疾病阶段COVID-19患者PBMC中BCR组库中的免疫球蛋白同种型。IgA, IgG, IgD, IgE和IgM的比例在框图中以平均值+SD表示,而饼图显示每个同种型的平均值。来自COVID-19患者的样品分为三组:(A) 症状发作后4-7天的样品 (n=8); (B) 症状发作后8-15天的样品 (n=10); (C) 症状发作后17-22天的样品 (n=5); (D) 亚洲健康对照样品 (n=15)。

[0059] 图3.图1是显示4个受试者的TCR和BCR组库(repertoire)纵向分析的图表。从症状发生后的早中期(第3天、5天、7天、12天、14天)到恢复阶段(第17天、19天)的3名患者收集样品。以健康季节性四价流感疫苗接种者接种疫苗前后(第0、4、14、28天)的样品作为对照。(A) TCR-TRA、-TRB、-TRD、-TRG和BCR-IgH、-IgK、-IgL在适应性免疫组库中的比例。(B) 在症状发生后的指定时间点上,7条链中的每条链中代表独特CDR3克隆型的树形图(treemap)。7个树形图分别代表TCR-beta、-alpha、-delta、-gamma和BCR-IgH、-IgK、-IgL。树形图中的一个矩形代表一个独特的克隆型。矩形的大小表示单个CDR3序列的相对频率,而不同的方形大小则反映了采样的免疫组库中克隆扩增的区域。从左上图顺时针到下图。IgH, IgK, IgL, TRB, TRA, TRD和TRG。

[0060] 图4显示ICU患者PBMC中TCR和BCR组库的树形图。(A) 包含来自患者4和患者5在症状发生后第4天的7条适应性免疫链的树形图。对照组树形图来自接种季节性四价流感疫苗前的同一健康人。(B) 包含总TCR-beta独特CDR3克隆型的树形图,每个代表患者4、患者5和健康对照。树形图中的一个矩形代表一个独特的克隆型。矩形的大小表示单个CDR3序列的相对频率。每个树形图中各个CDR3序列的颜色是随机选择的,因此,这些图之间的颜色不匹配。

[0061] 图5:10例确诊的Covid-19患者的总结。

[0062] 图6:COVID-19患者与健康对照PBMC中免疫组库的比较。与图1相关。BCR的IgH, IgK和IgL以及TCR-alpha (TRA), TCR-beta (TRB), TCR-delta (TRD) 和TCR- $\gamma$  (TRG)的比例表示为上述图中的中值,饼图显示了每个链的中值。来自COVID-19患者的样品显示为中值(A) 样品 (n=23), (B) 健康对照的样品 (n=15)。

[0063] 图7:COVID-19患者与健康对照组之间PBMC中的Ig同种型的比较。与图2相关。IgA, IgG, IgD, IgE和IgM的比例在上图中以中值表示,饼图显示了每种同种型的中值。(A) COVID-19患者的样品 (n=23), (B) 健康对照。

## 具体实施方式

[0064] 以下的实例、应用、说明和描述是示例性和解释性的，而不应解释为对本发明范围的限制。

[0065] TCR和BCR组库随COVID-19疾病进程显示动态变化

[0066] 在这项研究中，我们调查了来自COVID-19疾病不同阶段患者的PBMC样品。通过免疫组库分析，我们确定了疾病过程中TCR和BCR动态变化的模式。结果TCR和BCR库在COVID-19病程中显示出动态变化。我们从不同疾病阶段的COVID-19患者中收集了23个样品(图5)。该队列包括4位男性和6位女性，中位年龄为57岁(33-81岁不等)。收集至少一个时间点的外周血单核细胞(PBMC)。从3名患者收集了4个样品，样品范围从早期到恢复阶段(图5)。正常收集15位亚洲健康捐献者的外周血样品对照组，其中9例男性和6例女性，年龄在22-67岁之间。健康捐赠者的纳入标准是：1)以前没有诊断出慢性病；和2)在过去三个月中没有任何急性疾病的诊断。此外，我们使用了4个来自57岁健康季节性流感疫苗的PBMC样品作为纵向健康对照。我们一次PCR反应无偏倚地扩增了包括所有TCR链(TCR- $\alpha$ , TRA, TCR- $\beta$ , TRB; TCR- $\delta$ , TRD; TCR- $\gamma$ , TRG)和BCR链(IgH, 包括各种IgH同型IgK; 和IgL)的免疫组。每个样品进行约500万次总测序读数。iRepertoire的数据分析管道进一步分析了数据(Wang等人, 2010; Yang等人, 2015)。

[0067] 以前，淋巴细胞减少症被认为是COVID-19患者的常见表现，尤其是T淋巴细胞(Guan W等, NEJM, 2020; Huang等, Lancet, 2020)。与这些报告一致，入选样品的淋巴细胞计数绝对值也降低了，但是详细的TCR和BCR的表达尚不清楚。我们发现，TCR的mRNA表达( $n=23$ )显著低于健康对照( $n=15$ ) (图1D、图6)。与对照组相比，TCR- $\alpha$ 表达在免疫组库中的平均比例由28.3%降至4.9%，TCR- $\beta$ 表达的平均比例由18.7%降至5.2%，分别下降了5.8倍和3.6倍。COVID-19样品中IgH、IgK、IgL的比例(图6)均高于健康对照组(图1D)，尤其是IgL的平均比例由8.5%增加到23.5%。

[0068] 此外，我们根据疾病的进程将这些样品分为几组：第1组，症状发作后4-7天的样品( $n=8$ )；第2组，症状出现后8-15天的样品发作( $n=10$ )；第3组，症状发作后17-22天( $n=5$ )。分析表明，在对应于第1组和第2组的样品上，TCR- $\alpha$ 和TCR- $\beta$ 链的mRNA表达频率较低，但这些表达TCR链在第3组(恢复期)的第17-22天增加。令人惊讶的是，第3组中的TCR- $\beta$ / $\alpha$ 表达与正常对照组相似。这表明TCR- $\beta$ / $\alpha$ 表达可用作从SARS-COV-2病毒感染中恢复的参考指标。在所有时间点上，IgH/IgK/IgL表达相对于整体适应组(adaptome)的百分比均高于健康对照组，但第17-22天的IgK表达低于IgK在对照组中表达。总之，TCR表达在早期疾病分期显著降低，IgH/IgK/IgL表达增加可能是由于体液免疫系统应答病毒感染引起的结果。

[0069] 发病后，BCR组库具有从IgM到IgG的同种型转换和短暂的IgA激增

[0070] 针对SARS-COV-2感染，首先动员了IgM并将其类别转换为IgG同种型。在COVID-19患者第4至7天的样品( $n=8$ )中，IgM的中值百分比为19.5%，而对照组为43.6% (图2)。感染的早期阶段IgG的表达与健康对照组相比增加了约10%，在感染的顶点增加到总IgH表达的40%，而在恢复期则稍微降低到33.5% (图2)。另一个值得注意的变化是早期感染(第4-7天)期间的IgA比例与健康对照组的42.6%相比显著增加至60.1%，而在后期COVID-19患者中则为43.3%至46.4% (图2, 图7)。第8-15天的样品中IgA水平迅速下降至的对照水平。这

些结果表明,IgM/IgG/IgA被动员而应答冠状病毒感染。

[0071] 免疫组库的动态变化揭示了COVID-19疾病的进展。

[0072] 为了观察COVID-19患者的免疫组库动态,我们纵向跟踪了3名患者的免疫组库,每组有4个时间点,涵盖从发病初期到恢复期。我们发现,在疾病早期,TCR-beta极低。随着整个疾病的改善,TCR-beta逐渐增加,尤其是在恢复期(第四个时间点)。TCR-beta的百分比增加到与健康对照相同的水平(图1,图3)。该结果表明TCR-beta恢复正常水平是恢复的参考指标。我们还发现组库中的IgH逐渐随着疾病的消退而减少。它是在症状发作后第4-7天为最高水平,并在第19天或第20天恢复到约20%的水平(图3)。IgL的比例为在症状发作后第4-7天最高,并且在整个过程中呈下降趋势疾病(Pt2和Pt3)。与每年接种流感疫苗的健康季节性流感疫苗的组库相比,TCR和BCR链的比例接种前(第0天)和接种后28天(图3)相对稳定。

[0073] 使用树形图对这三名患者进行的纵向分析显示,TCR-beta表达在恢复期增加到正常水平。除了在TCR-beta表达谱中存在一些显性克隆外,克隆型的多样性在恢复期(时间点4)显著提高。IgH/IgK/IgL表达的显著特征是感染后两周左右(第三个时间点,第12天为Pt1,第14天为Pt2和Pt3)存在显著克隆扩增,表明冠状病毒特异性B细胞克隆在组库中占主导地位。这是非常重要的发现,因为它显示免疫系统会对这种新型病毒产生体液应答。它还提供了将其中一些或几个克隆扩增的IgH序列作为中和抗体来源可能性。

[0074] 大约15%的COVID-19患者出现了严重的疾病(Guan等,2020)。因此,我们分析了2名患者在症状发作后第4天和第6天获得的由于疾病的严重性而被送入重症监护病房(ICU)的两个样品。类似于我们在其他早期感染样品中发现的,IgH/IgK/IgL在树状图中占主导地位,而与健康人相比,TCR-beta表达显著降低(图4)。在IgK表达上发现了许多优势克隆,并且该链的多样性低于组库中的健康对照。

[0075] 对COVID-19患者中TCR和BCR动态的讨论研究为临床治疗提供了有价值的见解。在这里,我们在分子水平展示了免疫系统如何应对SARS-COV-2感染。可视化TCR和BCR的动态全景图展示适应性免疫系统和疾病如何进展直至恢复。异常表达的疾病早期TCRs和BCRs的概况,特别是TCR-alpha和TCR-beta表达,以及在恢复期恢复这种表达可能是潜在的疾病恢复的参考指标。最初不存在TCR alpha和TCR-beta表达与Covid-19患者显示的淋巴细胞减少的临床数据一致。这意味着这些T-细胞可能会离开循环并进入肺或淋巴器官等组织,或者由于病毒感染而死亡。T细胞在病毒清除和随后建立抗体介导的针对病毒感染的保护中发挥作用(Schmidt和Varga,2018;Zhao等,2014)。具有MERS-CoV感染的T细胞缺陷小鼠而非B细胞缺陷小鼠导致病毒在肺中的持久性,表明T细胞清除病毒的直接作用(Zhao等,2014)。COVID-19患者中CD8+T细胞的减少导致耗竭,这是需要ICU治疗的指标(Diao等,2020)。与最低的淋巴细胞计数证据一致的是在症状发作后的第4天(Zhou等,2020a),我们发现TCRs的表达中度或重度患者在感染早期(第4-7天)显著下降。一种解释是病毒引起的肺炎增加了血管通透性和趋化因子募集的T细胞无选择地泄漏到肺中(Russell et al.,2017)。需要进一步的研究来阐明重度以及感染初期感染较轻的人的肺部支气管肺泡灌洗液中是否存在T细胞。

[0076] 在B细胞应答方面,动员了IgM/IgG和IgA对抗病毒感染。IgH链内的克隆扩增在两周后是明显的。重要的是,B细胞亚群内的克隆扩增提供了证据表明人类适应性免疫系统正

在对这种新型致病病毒启动应答。IgM被认为是启动抗原暴露的第一抗体同种型，SARS-CoV-2特异性IgM抗体的测量可以帮助快速诊断病毒感染 (Sheridan, 2020年)。在本研究中IgM和IgG的转录水平异常可在早至SARS-CoV-2感染的第4天发现，而IgM/IgG的血清滴度在发病后第7-14天出现 (Long等, 2020; Mo等, 2006; Zhao等, 2020)。因此，可以快速检查IgM/IgG/IgA的异常情况，以诊断未知病原体。其他来源的证据资料显示，即使清除病毒超过六个月，相对IgG的表达仍可能更高，这表明病毒特异性抗体在生发中心持续处于亲和力成熟状态 (Davis等, 2019; Niu等, 2020; Wec等, 2020)。另一个令人惊讶的发现是感染初期的IgA优势。据我们所知，这是第一份报告新型病毒感染后可在外周血中激活IgA。了解IgA激活并鉴定外周血中的IgA抗体对于分离IgA-特异性抗体和诊断是十分有用的。IgA在粘膜免疫中起重要作用 (Gleeson等, 1995)。IgA表达百分比的增加表明IgA可以合成并迁移，对呼吸道或胃肠道发挥免疫功能以清除病毒 (Macpherson等人, 2008)。

[0077] 先前的研究主要针对TCR-beta或IgH链组库，以表明对癌症免疫疗法、自身免疫性疾病或病毒感染的适应性免疫应答 (Davis等人, 2019; Hopkins等人, 2018; Niu等人, 2020; Wendel等人, 2018; Wu等人, 2018)。此处使用的多重PCR方法——避免二聚体的多重PCR (dam-PCR)，可在一个PCR反应中具有包容性和定量模式的同时进行TCR-alpha, -beta, -gamma, -delta链和BCR-IgH, -IgK, -IgL的扩增 (Han和Lotze, 2020)。据我们所知，这是首次系统阐明COVID-19患者的BCR和TCR组库的报告。

[0078] 所有IgH/IgK/IgL链的纵向分析可以显示抗体组库随时间变化的整体视图。结合BCR组库分析的SARS-CoV-2特异性B细胞单细胞PCR将加快通过NGS和经典抗体克隆对谱系发展和中和抗体的鉴定 (Niu et al., 2020; Setliff et al., 2019)。总之，这项研究的结果提供了对COVID-19患者免疫动力学的全面了解。整体和纵向分析COVID-19患者的适应性免疫可以提供有关病毒感染机理的见解，为临床治疗提供指导信息，并协助开发抗病毒疗法和疫苗。

[0079] 主要材料和试剂

[0080]	材料和试剂	来源	货号
--------	-------	----	----

	生物样品		
	来自人供体的 PBMC 样品		N/A
	化学品		
	DNase/RNase-Free 双蒸水	ThermoFisher	Cat# 10977015
	50 x TAE 缓冲液	Sangon	Cat# B040123
	溴化乙锭储备溶液	Sangon	Cat# B548101
	DNA Marker	Sangon	Cat# B600109
	6 x 甘油 DNA 上样缓冲液	Sangon	Cat# B548313
[0081]	琼脂糖 N	Sangon	Cat# A501004
	乙醇	Sigma-Aldrich	Cat# E7023
	FLUBLOK® 四价流感疫苗	SANOFI PASTEUR INC.	N/A
	主要商业测定法		
	RepSeq+ Cassette	iRepertoire Inc	Cat# RepSeq+HLRI-Cabdghkl
	RNeasy Mini 试剂盒	Qiagen	Cat# 74104
	NovaSeq 6000 SP 试剂盒 (500 循环)	Illumina	Cat# 20029137

#### [0082] 样品收集

[0083] 血液样品取自广州医科大学附属广州市第八人民医院。所有患者均签署了捐献血样的知情同意书。本研究经广州医科大学伦理审查委员会批准。所有健康对照组在采集外周血前均签署了书面知情同意书。本研究的设计和招募15名亚洲健康供体的工作得到了新英格兰独立审查委员会® (NEIRB) 的批准 (IRB编号:14-378)。所有实验均按照相关指南和规定进行。

#### [0084] PBMC的分离和RNA的提取。

[0085] 通过Ficoll-Hypaque梯度上的密度梯度分离法分离PBMC,如Niu等人先前所述, *Emerg Microbes Infect* 9,111-123 (2020)。(GE Healthcare,Chicago,IL,USA)。根据制造商的协议使用Invitrogen公司TRIzol™ LS试剂提取总RNA。

#### [0086] TCRs和BCRs的无偏倚扩增。

[0087] iR-RepSeq-plus 7-Chain Cassette (iRepertoire) 用于生成涵盖所有TCR和BCR链的NGS文库,包括TCR-beta、-alpha、-delta、-gamma和BCR-IgH、-IgK、-IgL。所有7条链都是在一次检测中扩增的,使用的策略允许在逆转录 (RT) 步骤中加入独特的分子标识符。一个一次性盒用于一个样品的文库制备;扩增和纯化所需的所有试剂都预装到盒中。将1000ng提取的RNA与适量的RT混合液和无核酸酶水加入盒中,由iR-Processor进行处理。该仪器自动设置进行所有的扩增和纯化。简单地说,RT使用Qiagen OneStep RT-PCR混合液 (Qiagen) 进行。选择第一链cDNA,通过SPRIselect珠子选择 (Beckman Coulter) 去除未使用的引物,然后用V-基因引物混合液进行第二轮结合和延伸。结合和延伸后,用SPRIselect珠子纯化第一链和第二链合成产物。用一对引物进行文库扩增,这对引物是特异性的公共位点,工程化到第一和第二链合成中使用的C-和V-引物的5'端。最终构建的文库包括

Illumina双索引测序接头,10个核苷酸独特的分子标识符区域,以及与C-基因引物相关联的8个核苷酸内部条形码。通过商业测序服务实验室(Personal Biotechnology Co.,Ltd., Shanghai,China)在Illumina NovaSeq平台上用500-cycle试剂盒(250个配对末端读数)对扩增的文库进行多重和汇集测序。输出的免疫受体序列涵盖了第一框架区域内到恒定区域的开始,包括CDR1、CDR2和CDR3。

[0088] 数据收集和生物信息学分析

[0089] 使用Wang等人,Proc Natl Acad Sci USA 107,1518-1523(2010)和Yang等人,Elife 4,e09083(2015)描述的iRmap程序分析原始数据。简而言之,根据来自恒定区域的读数的5'端条形码序列,对序列读数进行去多重化(de-multiplexed)。然后根据它们的碱基质量用2个碱基滑动窗口对读数进行修剪。如果该窗口中的任何一个质量值低于20,则从窗口延伸到3'端的序列从原始读数中被修剪出来。修剪后的配对末端读数通过修改的Needleman-Wunsch算法利用重叠比对连接在一起。如果重叠区域中成对的正向和反向读数不完全匹配,则正向和反向读数均被丢弃,不作进一步考虑。合并的读数使用Smith-Waterman算法映射到从IMGT网站下载的种系V、D、J和C参考序列(Lefranc,2003)。为了定义CDR3区域,通过映射结果将IMGT数据库中参考序列的CDR3边界位置迁移到读数上,并将所得CDR3区域提取并翻译成氨基酸。通过唯一分子标识符(UMIs)和CDR3区域的组合,对数据集进行了浓缩,以去除由测序和扩增引入的不正确的CDR3。具有CDR3和UMI的相同组合的读数被浓缩成一个UMI计数。

[0090] 从COVID-19患者队列中获得了最大集群中最具影响力的CDR3序列(IMGT),并列于表1和表2中。发明人还对分别选自表1和表2的10个轻链和10个重链基因进行了基因合成(其中一些残基可以进行适当修饰,例如插入、缺失和/或置换)。将这些基因克隆到表达载体中,克隆成功后对编码区和阅读框进行测序确认。用体外转录翻译试剂盒与修饰过的载体,纯化后得到抗体。通过ELISA检测实验检测了本发明的示例性抗体(结果如下表所示),其显示了对SARS-CoV-2的抗原蛋白的高特异性高亲和力结合(例如以 $10^{-10}$  M或更小的KD结合SARS-CoV-2抗原)。通过SARS-CoV-2假病毒侵入细胞体外实验表明本发明的抗体具备优异的抑制假病毒侵入细胞的活性。表3列出了本发明的示例性抗体序列(其高特异性高亲和力结合SARS-CoV-2的NP蛋白)。

[0091] 表1

SEQ ID NO	CDR3 肽序列
1	CYSTDSSGDQYVF

[0092]

[0093]

2	CQSYDGSLSEFAVF
3	CQQYGSSPWTF
4	CQQSFSSPRTF
5	CQTHDSRLNAYVF
6	CQLWDTSSDHWVF
7	CQSADSSATLWVF
8	CQQYNYWWTF
9	CQQYDHLIFTF
10	CQSADSSGTYWVF
11	CQSYDNVNYVF
12	CQQYGSSPLTF
13	CSSYTSSSTWVF
14	CSSYTSSSTLVF
15	CQQYNDWPRTF
16	CQQYGSSPITF
17	CQSYDSSLSGSVF

[0094] 表2

[0095]

SEQ ID NO	CDR3 肽序列
18	CARGRDIVVEPTDADPFDPW
19	CARGDYDSESYWFDPW
20	CAREESEAGGLRMIRGVLHQDRYNRFDSW
21	CARDTFCSGGNCYSYGMDVW
22	CVREAYYCGDTGCVGDGRWYDPW
23	CARGVRRINMMVLVITSTEDALDIW
24	CARAPKDYYGSGSFRWFPW
25	CATDSILGVVIYAFVFW
26	CATDSPRPIVVYAFAMW



[0096]

27	CAHRDAPGAYDAFHIW
28	CARRTLFRRHFDPW
29	CAHRDAPGAYDAFHVW
30	CARRSPFVDTPGLGYFMDVW
31	CARDRYLWFGEDDFW
32	CTTRLVAVGRFDYW
33	CARELDKSYMDVW
34	CARDEDHDNSAPLYW
35	CARDEDYDNSAPLYW
36	CAREVVWCGAECYPEAFDYW
37	CARPYCPNGVCYHQPRSSYMDVW
38	CARHDTDHDCSRTTCHAFDTW
39	CARDVSGWYLGILAYYYYGMDVW
40	CAKDILGWAFDYW
41	CARDLCGADDYW
42	CASWLQNHFDYW
43	CARSSLNGDQSYFDSW
44	CARSPVRFFDWFRSDHFDYW
45	CARRSPFVATPGLGYFMDVW
46	CTTGASITIFGVVIIGQAFDIW
47	CARGKRIAAAGILLPRYYYGMDVW
48	CARGWRGAVAGTLVYYYYYGGMDVW
49	CARHPMSTITIFGVVISQPFDYW
50	CVRDGSYDILTGYPSEFDYW
51	CARNMRYCSGGRCYPPGAFDMW
52	CARGTSSPPKRPRPSGVIGLSFKSTPNWDLDLW
53	CARGRVTKNGGITTSGPYYGMDAW

[0097]

54	CARGRVTKNAGITTSGPYYAMDAW
55	CVRTVRSQYQVLFDTYYYYHMDVW
56	CARHVDSWLHVDIVATNYHHGLDVW
57	CARGRDIVVEPTDTPFDIW
58	CAGEVDRSRSWDDGYGLDVW
59	CARAAGGYHGSTSYYYYGLDVW
60	CARMRSCSSRWRGWFDPW
61	CATDSVRPIVVYAFVMW
62	CAKLGKHTALVVSWLEPDYW
63	CARPYCPNGICYHQPKSLYNMDVW
64	CARPYCPNGVCYHQPRSSYYMDVW
65	CARGLDFGKSDYGYFFDYW
66	CAKNYDYVWGSYRSLRLRPLHPW
67	CARDSFCSGGKCYSYGMDVW
68	CARMTYSGSWRSYWYFDLW
69	CARSYGGNSMDAFHIW
70	CARARKTLNMLVVVITSAEYYFDYW
71	CARLRAVVTPDWSSEAFFDLW
72	CARRSSRCQYPCYYYGMDVW
73	CARDGEGYSSGWYHGIQVAPTNWFDPW
74	CARSSLNGDQSYFDSW
75	CAREVIRGHYSYTLQGIFDPW
76	CARLRTFMAATNTPDAFDFW

[0098] 表3:本发明的示例性抗体 (B280108) 序列。

<b>抗体编号: Cov_WL_1</b>	<b>项目编号: B280108</b>
<p><b>重链基因序列:</b> 信号肽 - VH- CH (Human IgG1)</p> <p>GCGGCGCGAAACTACAAGACAGACTTGCAAAGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCTCTCTGA                  CTGGGGTGAGGGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGAGGTGAAAAGCCCGGCCTCAGTGAAGTGA                  GCTGCAAGGTGAGCGGCTTACCGTGAGCGAGCTGAGCATCTACTGGGTGAGACAGAGCCCGGAAAAGGCCTGG                  AGTGGATGGGAAACATCGACGCTGTGTATGGGAGACAACCTACGCTCAGAAGTTCGAGGGCAGACTGACCCTGAC                  CGAGGACACCAGCACCGAGACAGCCTACATGGAGCTGAGAAGCCTGACCAGCGAAGATACTGCTATCTACTATTGCG                  CCACCGACTCCCCCGCCCATTTGGTGTACGCCTTTGCCATGTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCTCC                  GCTAGCACCAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG                  CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACA                  CCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA                  CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGA                  CAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAACCC                  CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG                  TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGC                  ACGTACCGTGTGGTGTGAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC                  AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACC                  CTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC                  ATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGG                  CTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAGCTTCTCATGCTCCGTGAT                  GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGATTCTAGA</p> <p><b>氨基酸序列:</b>                  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFTVSELSIYVWRQSPGKGLEWGMNIDAVYGETTYAQKFEGRLLTLEDTSTETAYMEL                  RSLTSEDTAIYYCATDSPRPIVVYAFAMWVGQTMVTVSS                  ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN                  HKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN                  AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV                  KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p><b>轻链基因序列:</b> 信号肽 - VL- CL (Human Kappa)</p> <p>GCGGCGCGAAACTACAAGACAGACTTGCAAAGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCTCTCTGA                  CTGGGGTGAGGGGCCAGATTGTGATGACACAGAGCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCCGAGAAAGAGCCACAC                  TGTCTGTAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCAGCAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAGGCCTGGGCAGGCCCCAGACT                  GCTGATTTACGGCGCTCTGCCAGAGCCACGGGGTGCCTGGACGCATCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACAGAGTT                  CACCCTGACCATCTCTACTGCAGAGCGAGGACTGCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACAATGACTGGCCAGAA                  CCTTTGGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG                  CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCCTCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT                  GCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA                  GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT                  ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGG                  GAGAGTGTGATTCTAGA</p> <p><b>氨基酸序列:</b>                  EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQRRPGQAPRLLIYGASARATGVPGRISGSGSGTEFTLTISSLQSEDCAVY                  YCQQYNDWPRIFGQGTKVEIK                  RTVAAPSFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNLFYPREAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLKADYKHKV                  YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	

[0099]

[0100] 上述抗体的重链基因序列、重链氨基酸序列、轻链基因序列、轻链氨基酸序列分别编号为SEQ ID NOS:77,78,79,和80,所述抗体根据Kabat编号表示的轻链和重链CDR分别如下表4所示。

[0101]

CDRs	序列	SEQ ID Nos:
CDR-H1	ELSIY	81
CDR-H2	NIDAVYGETTYAQKFEQ	82
CDR-H3	DSRPPIVVYAFAM	83
CDR-L1	RASQSVSSNLA	84

CDR-L2	GASARAT	85
CDR-L3	QQYNDWPRT	86

[0102] ELISA检测实验

[0103] 抗原:2019-nCoV-NP-His,Bioimtron Cat.#B233501)

[0104] SARS-CoV-2 S protein,Acor,Cat.#SPN-C52H4

[0105] S1-RBD-His Bioimtron Cat.#B232004

[0106] 二抗:Goat Anti-Human IgG Fc HRP,Jackson Immuno Research,109-035-008

[0107] 1包被:

[0108] 1.1根据抗原蛋白的浓度,用包被缓冲液将抗原蛋白稀释至2ug/ml,配制量20ml,混匀后,向酶标板各孔中加入100ul稀释后的抗原蛋白(2ug/ml),轻轻振荡酶标板使抗体覆盖酶标板孔底。

[0109] 1.2封板,4℃过夜孵育。

[0110] 2封闭:

[0111] 2.11XPBS缓冲液洗酶标板3次后,加入200ul封闭液进行封闭。

[0112] 2.2加入封闭液后在培养箱中37℃孵育1h。

[0113] 2.31X PBS/吐温缓冲液冲洗酶标板5次。

[0114] 3加待测样(表达抗体):

[0115] 第一个孔抗体的初始浓度是:10ug/ml,用PBS稀释后加入,1/5梯度往下稀释7个孔,设置复孔。

[0116] 3.2封板后在37℃作用1小时。

[0117] 3.3将酶标板内的液体甩干,200ul 1X PBS/吐温缓冲液冲洗酶标板5次。

[0118] 4加二抗(Goat Anti-Human IgG HRP):

[0119] 4.1根据实验所需量配制二抗溶液,每5ml 1XPBS加1ul二抗,混匀后向酶标板各孔中加入100ul稀释后的二抗。

[0120] 4.2封板后37℃下作用30min。

[0121] 4.3将酶标板内的液体甩干,200ul 1X PBS/吐温缓冲液冲洗酶标板5次。

[0122] 5加底物:

[0123] 5.1每孔加入100ul OPD显色液(OPD配制:10ml底物缓冲液+40ulOPD+5ul H2O2),37℃孵育10min之后,加入50ul终止液(0.25M HCl)终止显色反应

[0124] 5.2酶标仪492nm处读取光密度值。

[0125] 抗体中和实验(检测抗体对病毒的中和效果)

[0126] 假病毒的制备:转染前一天,接种293T细胞于75cm大皿方瓶中。细胞80%汇合度时进行转染。准备质粒混合物:3ug PVRC8304,9ug PCMV8.2,12ug PHR-CMV-Luciferase,62ul 2M CaCl<sub>2</sub>,加水至500ul,混匀后逐滴缓慢加入到500ul2xHEBS中,边加边用涡旋器剧烈混匀,冰上静置20min。期间弃去293T细胞培养基,用10ml新鲜培养基替代。转染前5min,细胞瓶中加入25ul 50mM的氯喹,然后逐滴将上述沉淀加入到293T细胞上,37度,5%CO<sub>2</sub>培养8h后置换新鲜DMEM培养基继续培养。分别在48h和72h收获上清,2500r/min,4度离心10min,上清用0.45um滤器过滤后分装,此为含SARS-COV-2基因的假病毒,冻存负80度备用。用BIOMERIEUX的Vironostika HIV-1抗原微量ELISA检测试剂盒测定,计算P24含量,根据P24

含量确定微量中和试验的假病毒所需剂量。

[0127] 假病毒微量中和试验:实验前一天在96孔平底板接种293T-ACE2细胞(过表达ACE2蛋白的293T细胞),第二天观察接种细胞,待细胞铺满孔面积的80%以上进行实验。用细胞培养液以1:100,1:300,1:900和1:2700稀释抗体,取50u1不同浓度的稀释抗体与等体积的假病毒混合,置于37度孵育1h。随后将上述混合液以100u1/孔接种到铺好293T-ACE2细胞的96孔板中,每一稀释度接种3孔,同时设定3孔阴性对照和3孔假病毒阳性对照。将96孔培养板置于37度,5%CO2培养箱孵育48h后,弃去培养板中的培养液,将96孔板在面巾纸上轻轻拍干,加入细胞裂解液(30u1/孔),作用时间大于10min;之后每孔加70u1 Luciferase试剂,用排枪吹打均匀,吸取70u1混合液于新的96孔培养板,将其放置于Modulus 96孔微孔板型多功能光度计上测定荧光值。最终计算以阳性对照孔中细胞的荧光值为参照,分别计算实验孔和阴性血清对照孔的中和效率。

[0128] 虽然已经详细描述了本发明及其优点,但应该理解的是,在不违背发明精神的情况下,可以进行各种修改和替换。本文描述的方法及其各种实施例是示例性的,也可以包括其他实施方案。

[0129]

包被(2µg/ml)	羊抗人一抗(测上清表达量)		
样品	B280108	标准品(2.5ug/ml)	
Antibody Conc.(ug/ml)	8	10	
10.00000	A	2.081	2.151
2.00000	B	2.025	2.027
0.40000	C	2.1	1.949
0.08000	D	1.97	1.214
0.01600	E	2.044	0.536
0.00320	F	1.579	0.178
0.00064	G	0.871	0.083
0.0000	H	0.051	0.08
表达量(mg/L)		459.18	
Goat Anti-Human IgG HRP +OPD			

		<b>Binding ELISA</b>	
包被(2µg/ml)		<b>2019-nCoV-NP-His,Bioimtron Cat.#B233501</b>	
样品		<b>B280108</b>	对照
Antibody Conc.(ug/ml)		8	9
10.00000	<b>A</b>	2.26	0.083
2.00000	<b>B</b>	2.267	0.049
0.40000	<b>C</b>	2.272	0.067
0.08000	<b>D</b>	2.295	0.061
0.01600	<b>E</b>	2.18	0.065
0.00320	<b>F</b>	1.951	0.063
0.00064	<b>G</b>	1.436	0.06
0.0000	<b>H</b>	0.079	0.069
Goat Anti-Human IgG HRP +OPD			

[0130]

[0131]

包被(2µg/ml)		<b>SARS-CoV-2 S protein,Arco Cat.#SPN-C52H4</b>	
样品		<b>B280108</b>	对照
Antibody Conc.(ug/ml)		8	9
10.00000	<b>A</b>	0.054	0.054
2.00000	<b>B</b>	0.045	0.051
0.40000	<b>C</b>	0.046	0.074
0.08000	<b>D</b>	0.045	0.059
0.01600	<b>E</b>	0.045	0.046
0.00320	<b>F</b>	0.045	0.053
0.00064	<b>G</b>	0.05	0.054
0.0000	<b>H</b>	0.047	0.047
Goat Anti-Human IgG HRP +OPD			

[0132] 参考文献

[0133] Davis,C.W.,Jackson,K.J.L.,McElroy,A.K.,Halfmann,P.,Huang,J.,Chennareddy,C.,Piper,A.E.,Leung,Y.,Albarino,C.G.,Crozier,I.,et al. (2019) .Longitudinal Analysis of the Human B Cell Response to Ebola Virus Infection.Cell 177,1566-1582e 1517.

[0134] Davis,M.M.,Tato,C.M.,and Furman,D. (2017) .Systems immunology:just getting started.Nat Immunol 18,725-732.

[0135] Diao,B.,Wang,C.,Tan,Y.,Chen,X.,Liu,Y.,Ning,L.,Chen,L.,Li,M.,Liu,Y.,Wang,G.,et al. (2020) .Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) .medRxiv, 2020.2002.2018.20024364.

[0136] Gleeson,M.,Cripps,A.W.,and Clancy,R.L. (1995) .Modifiers of the human mucosal immune system.Immunol Cell Biol 73,397-404.

- [0137] Guan,W.J.,Ni,Z.Y.,Hu,Y.,Liang,W.H.,Ou,C.Q.,He,J.X.,Liu,L.,Shan,H.,Lei,C.L.,Hui,D.S.C.,et al.(2020).Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019in China.N Engl J Med.
- [0138] Han,J.,and Lotze,M.T.(2020).The Adaptome as Biomarker for Assessing Cancer Immunity and Immunotherapy.Methods Mol Biol 2055,369-397.
- [0139] Hopkins,A.C.,Yarchoan,M.,Durham,J.N.,Yusko,E.C.,Rytlewski,J.A.,Robins,H.S.,Laheru,D.A.,Le,D.T.,Lutz,E.R.,and Jaffee,E.M.(2018).T cell receptor repertoire features associated with survival in immunotherapy-treated pancreatic ductal adenocarcinoma.JCI Insight 3.
- [0140] Huang,C.,Wang,Y.,Li,X.,Ren,L.,Zhao,J.,Hu,Y.,Zhang,L.,Fan,G.,Xu,J.,Gu,X.,et al.(2020).Clinical features of patients infected with 2019novel coronavirus in Wuhan,China.Lancet395,497-506.
- [0141] Lefranc,M.P.(2003).IMGT,the international ImMunoGeneTics database.Nucleic Acids Res 31,307-310.
- [0142] Long,Q.-x.,Deng,H.-j.,Chen,J.,Hu,J.,Liu,B.-z.,Liao,P.,Lin,Y.,Yu,L.-h.,Mo,Z.,Xu,Y.-y.,et al.(2020).Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients:the perspective application of serological tests in clinical practice.medRxiv,2020.2003.2018.20038018.
- [0143] Macpherson,A.J.,McCoy,K.D.,Johansen,F.E.,and Brandtzaeg,P.(2008).The immune geography of IgA induction and function.Mucosal Immunol 1,11-22.
- [0144] Mo,H.,Zeng,G.,Ren,X.,Li,H.,Ke,C.,Tan,Y.,Cai,C.,Lai,K.,Chen,R.,Chan-Yeung,M.,and Zhong,N.(2006).Longitudinal profile of antibodies against SARS-coronavirus in SARS patients and their clinical significance.Respirology 11, 49-53.
- [0145] Niu,X.,Yan,Q.,Yao,Z.,Zhang,F.,Qu,L.,Wang,C.,Wang,C.,Lei,H.,Chen,C.,Liang,R.,et al.(2020).Longitudinal analysis of the antibody repertoire of a Zika virus-infected patient revealed dynamic changes in antibody response.Emerg Microbes Infect 9,111-123.
- [0146] O'Donnell,R.,Tasker,R.C.,and Roe,M.F.(2003).SARS:understanding the coronavirus:apoptosis may explain lymphopenia of SARS.BMJ 327,620.
- [0147] Russell,C.D.,Unger,S.A.,Walton,M.,and Schwarze,J.(2017).The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection.Clin Microbiol Rev 30,481-502.
- [0148] Schmidt,M.E.,and Varga,S.M.(2018).The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections.Front Immunol 9,678.
- [0149] Setliff,I.,Shiakolas,A.R.,Pilewski,K.A.,Murji,A.A.,Mapengo,R.E.,Janowska,K.,Richardson,S.,Oosthuysen,C.,Raju,N.,Ronsard,L.,et al.(2019).High-Throughput Mapping of B Cell Receptor Sequences to Antigen Specificity.Cell 179,1636-1646e 1615.

- [0150] Sheridan,C.(2020).Fast,portable tests come online to curb coronavirus pandemic.Nat Biotechnol.Wang,C.,Sanders,C.M.,Yang,Q.,Schroeder,H.W.,Jr.,Wang,E.,Babrzadeh,F.,Gharizadeh,B.,Myers,R.M.,Hudson,J.R.,Jr.,Davis,R.W.,and Han,J.(2010).High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets.Proc Natl Acad Sci U S A 107, 1518-1523.
- [0151] Wec,A.Z.,Haslwanter,D.,Abdiche,Y.N.,Shehata,L.,Pedreno-Lopez,N.,Moyer,C.L.,Bornholdt,Z.A.,Lilov,A.,Nett,J.H.,Jangra,R.K.,et al.(2020).Longitudinal dynamics of the human B cell response to the yellow fever 17D vaccine.Proc Natl Acad Sci U S A.
- [0152] Wendel,B.S.,Del Alcazar,D.,He,C.,Del Rio-Estrada,P.M.,Aiamkitsumrit,B.,Ablanedo-Terrazas,Y.,Hernandez,S.M.,Ma,K.Y.,Betts,M.R.,Pulido,L.,et al.(2018).The receptor repertoire and functional profile of follicular T cells in HIV-infected lymph nodes.Sci Immunol 3.
- [0153] Wu,F.,Zhao,S.,Yu,B.,Chen,Y.M.,Wang,W.,Song,Z.G.,Hu,Y.,Tao,Z.W.,Tian,J.H.,Pei,Y.Y.,et al.(2020).A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.Nature 579,265-269.
- [0154] Wu,J.,Pendegraft,A.H.,Byrne-Steele,M.,Yang,Q.,Wang,C.,Pan,W.,Lucious,T.,Seay,T.,Cui,X.,Elson,C.O.,et al.(2018).Expanded TCRbeta CDR3 clonotypes distinguish Crohn's disease and ulcerative colitis patients.Mucosal Immunol 11,1487-1495.
- [0155] Yang,X.,Yu,Y.,Xu,J.,Shu,H.,Xia,J.,Liu,H.,Wu,Y.,Zhang,L.,Yu,Z.,Fang,M.,et al.(2020).Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan,China:a single-centered,retrospective,observational study.Lancet Respir Med.
- [0156] Yang,Y.,Wang,C.,Yang,Q.,Kantor,A.B.,Chu,H.,Ghosn,E.E.,Qin,G.,Mazmanian,S.K.,Hah,J.,and Herzenberg,L.A.(2015).Distinct mechanisms define murine B cell lineage immunoglobulin heavy chain(IgH) repertoires.Elife 4, e09083.
- [0157] Yuseff,M.I.,Pierobon,P.,Reversat,A.,and Lennon-Dumenil,A.M.(2013).How B cells capture,process and present antigens:a crucial role for cell polarity.Nat Rev Immunol 13,475-486.
- [0158] Zhao,J.,Li,K.,Wohlford-Lenane,C.,Agnihothram,S.S.,Fett,C.,Zhao,J.,Gale,M.J.,Jr.,Baric,R.S.,Enjuanes,L.,Gallagher,T.,et al.(2014).Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome.Proc Natl Acad Sci U S A 111,4970-4975.
- [0159] Zhao,J.,Yuan,Q.,Wang,H.,Liu,W.,Liao,X.,Su,Y.,Wang,X.,Yuan,J.,Li,T.,Li,J.,et al.(2020).Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.medRxiv,2020.2003.2002.20030189.



- [0160] Zhou,F.,Yu,T.,Du,R.,Fan,G.,Liu,Y.,Liu,Z.,Xiang,J.,Wang,Y.,Song,B.,Gu,X.,et al.(2020a).Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan,China:a retrospective cohort study.Lancet.
- [0161] Zhou,P.,Yang,X.L.,Wang,X.G.,Hu,B.,Zhang,L.,Zhang,W.,Si,H.R.,Zhu,Y.,Li,B.,Huang,C.L.,et al.(2020b).A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.Nature 579,270-273.
- [0162] Zhu,N.,Zhang,D.,Wang,W.,Li,X.,Yang,B.,Song,J.,Zhao,X.,Huang,B.,Shi,W.,Lu,R.,et al.(2020).A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China,2019.N Engl J Med 382,727-733.

## 序列表

<110> 江苏集萃医学免疫技术研究有限公司

<120> SARS-COV-2抗体及其用途

<130> IB206069

<160> 86

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 1

Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asp Gln Tyr Val Phe  
1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 2

Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Ser Leu Ser Glu Phe Ala Val Phe  
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 3

Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe  
1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 4

Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Pro Arg Thr Phe  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 5

Cys Gln Thr His Asp Ser Arg Leu Asn Ala Tyr Val Phe  
 1 5 10

[0002]

<210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 6

Cys Gln Leu Trp Asp Thr Ser Ser Asp His Trp Val Phe  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 7

Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Ala Thr Leu Trp Val Phe

1 5 10

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 8

Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Trp Trp Thr Phe  
1 5 10

<210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

[0003] <400> 9

Cys Gln Gln Tyr Asp His Leu Ile Phe Thr Phe  
1 5 10

<210> 10  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 10

Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Trp Val Phe  
1 5 10

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 11

Cys Gln Ser Tyr Asp Asn Val Asn Tyr Val Phe  
1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 12

Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe  
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

[0004] <223> CDR3肽序列

<400> 13

Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val Phe  
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 14

Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val Phe  
1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 15

Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Arg Thr Phe  
1 5 10

<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 16

Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr Phe  
1 5 10

<210> 17  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

[0005]

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 17

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val Phe  
1 5 10

<210> 18  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 18

Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ile Val Val Glu Pro Thr Asp Ala Asp Pro  
1 5 10 15

Phe Asp Val Trp  
20

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 19

Cys Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Glu Ser Tyr Trp Phe Asp  
 1 5 10 15

Pro Trp

<210> 20  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

[0006]

<400> 20

Cys Ala Arg Glu Glu Ser Glu Ala Gly Gly Leu Arg Met Ile Arg Gly  
 1 5 10 15

Val Leu His Gln Asp Arg Tyr Asn Arg Phe Asp Ser Trp  
 20 25

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 21

Cys Ala Arg Asp Thr Phe Cys Ser Gly Gly Asn Cys Tyr Ser Tyr Gly  
 1 5 10 15

Met Asp Val Trp  
 20

<210> 22  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 22

Cys Val Arg Glu Ala Tyr Tyr Cys Gly Asp Thr Gly Cys Tyr Gly Asp  
 1                                   5                                   10                                   15

Gly Arg Trp Tyr Asp Pro Trp  
 20

<210> 23  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

[0007]

<400> 23

Cys Ala Arg Gly Val Arg Arg Ile Asn Met Met Val Leu Val Ile Thr  
 1                                   5                                   10                                   15

Ser Thr Glu Asp Ala Leu Asp Ile Trp  
 20                                   25

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 24

Cys Ala Arg Ala Pro Lys Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Arg Trp  
 1                                   5                                   10                                   15

Phe Asp Pro Trp  
 20



<210> 25  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 25

Cys Ala Thr Asp Ser Ile Leu Gly Val Val Ile Tyr Ala Phe Val Phe  
 1 5 10 15

Trp

<210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

[0008]

<400> 26

Cys Ala Thr Asp Ser Pro Arg Pro Ile Val Val Tyr Ala Phe Ala Met  
 1 5 10 15

Trp

<210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 27

Cys Ala His Arg Asp Ala Pro Gly Ala Tyr Asp Ala Phe His Ile Trp  
 1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 14  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 28

Cys Ala Arg Arg Thr Leu Phe Arg Arg His Phe Asp Pro Trp  
1 5 10

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 29

Cys Ala His Arg Asp Ala Pro Gly Ala Tyr Asp Ala Phe His Val Trp  
1 5 10 15

[0009]

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 30

Cys Ala Arg Arg Ser Pro Phe Val Asp Thr Pro Gly Leu Gly Tyr Tyr  
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Trp  
20

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 31

Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Leu Trp Phe Gly Glu Asp Asp Phe Trp  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 32

Cys Thr Thr Arg Leu Val Ala Val Gly Arg Phe Asp Tyr Trp  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

[0010] <400> 33

Cys Ala Arg Glu Leu Asp Lys Ser Tyr Tyr Met Asp Val Trp  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 34

Cys Ala Arg Asp Glu Asp His Asp Asn Ser Ala Pro Leu Tyr Trp  
 1 5 10 15

<210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 35

Cys Ala Arg Asp Glu Asp Tyr Asp Asn Ser Ala Pro Leu Tyr Trp  
1 5 10 15

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 36

Cys Ala Arg Glu Val Val Trp Cys Gly Ala Glu Cys Tyr Pro Glu Ala  
1 5 10 15

Phe Asp Tyr Trp  
20

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 37

Cys Ala Arg Pro Tyr Cys Pro Asn Gly Val Cys Tyr His Gln Pro Arg  
1 5 10 15

Ser Ser Tyr Tyr Met Asp Val Trp  
20

<210> 38

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 38

Cys Ala Arg His Asp Thr Asp His Asp Cys Ser Arg Thr Thr Cys His

[0011]

1    5    10    15

Ala Phe Asp Thr Trp  
20

<210> 39  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 39

Cys Ala Arg Asp Val Ser Gly Trp Tyr Leu Gly Ile Leu Ala Tyr Tyr  
 1    5    10    15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
 20

[0012]

<210> 40  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 40

Cys Ala Lys Asp Ile Leu Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp  
 1    5    10

<210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 41

Cys Ala Arg Asp Leu Cys Gly Ala Asp Asp Tyr Trp  
 1    5    10

<210> 42

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 42

Cys Ala Ser Trp Leu Gln Asn His Phe Asp Tyr Trp  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 43

Cys Ala Arg Ser Ser Leu Asn Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Asp Ser Trp  
 1 5 10 15

[0013]

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 44

Cys Ala Arg Ser Pro Val Arg Phe Phe Asp Trp Phe Arg Ser Asp His  
 1 5 10 15

Phe Asp Tyr Trp  
 20

<210> 45  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 45

Cys Ala Arg Arg Ser Pro Phe Val Ala Thr Pro Gly Leu Gly Tyr Tyr  
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Trp  
20

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 46

Cys Thr Thr Gly Ala Ser Ile Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Ala Phe Asp Ile Trp  
20

[0014]

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 47

Cys Ala Arg Gly Lys Arg Ile Ala Ala Ala Gly Ile Leu Leu Pro Arg  
1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
20

<210> 48

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 48

Cys Ala Arg Gly Trp Arg Gly Ala Val Ala Gly Thr Leu Val Thr Tyr  
1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
20 25

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 49

Cys Ala Arg His Pro Met Ser Thr Ile Thr Ile Phe Gly Val Val Ile  
1 5 10 15

Ser Gln Pro Phe Asp Tyr Trp  
20

[0015]

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 50

Cys Val Arg Asp Gly Ser Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Ser Phe  
1 5 10 15

Asp Tyr Trp

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列



<400> 51

Cys Ala Arg Asn Met Arg Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Tyr Pro Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Phe Asp Met Trp  
20

<210> 52

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 52

Cys Ala Arg Gly Thr Ser Ser Pro Pro Lys Arg Pro Arg Pro Ser Gly  
1 5 10 15

Val Ile Gly Leu Ser Phe Lys Ser Thr Pro Asn Trp Asp Leu Asp Leu  
20 25 30

[0016]

Trp

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 53

Cys Ala Arg Gly Arg Val Thr Lys Asn Gly Gly Ile Thr Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Ala Trp  
20

<210> 54

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 54

Cys Ala Arg Gly Arg Val Thr Lys Asn Ala Gly Ile Thr Thr Ser Gly  
 1 5 10 15

Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Ala Trp  
 20

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 55

Cys Val Arg Thr Val Arg Ser Gln Tyr Gln Val Leu Phe Asp Thr Tyr  
 1 5 10 15

[0017]

Tyr Tyr Tyr His Met Asp Val Trp  
 20

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 56

Cys Ala Arg His Val Asp Ser Trp Leu His Val Asp Ile Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Asn Tyr His His Gly Leu Asp Val Trp  
 20 25

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 57

Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ile Val Val Glu Pro Thr Asp Thr Asp Pro  
 1 5 10 15

Phe Asp Ile Trp  
 20

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 58

Cys Ala Gly Glu Val Asp Arg Ser Arg Ser Trp Asp Asp Gly Tyr Gly  
 1 5 10 15

[0018]

Leu Asp Val Trp  
 20

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMAIN

&lt;223&gt; CDR3肽序列

&lt;400&gt; 59

Cys Ala Arg Ala Ala Gly Gly Tyr His Gly Ser Thr Ser Tyr Tyr Tyr  
 1 5 10 15

Tyr Gly Leu Asp Val Trp  
 20

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 60

Cys Ala Arg Met Arg Ser Cys Ser Ser Arg Trp Arg Gly Trp Phe Asp  
 1 5 10 15

Pro Trp

<210> 61  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 61

Cys Ala Thr Asp Ser Val Arg Pro Ile Val Val Tyr Ala Phe Val Met  
 1 5 10 15

[0019]

Trp

<210> 62  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 62

Cys Ala Lys Leu Gly Lys His Thr Ala Leu Val Val Ser Trp Leu Glu  
 1 5 10 15

Pro Asp Tyr Trp  
 20

<210> 63  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 63

Cys	Ala	Arg	Pro	Tyr	Cys	Pro	Asn	Gly	Ile	Cys	Tyr	His	Gln	Pro	Lys
1				5					10					15	

Ser	Leu	Tyr	Asn	Met	Asp	Val	Trp
			20				

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 64

Cys	Ala	Arg	Pro	Tyr	Cys	Pro	Asn	Gly	Val	Cys	Tyr	His	Gln	Pro	Arg
1				5					10					15	

[0020]

Ser	Ser	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp
				20			

<210> 65

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 65

Cys	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Gly	Lys	Ser	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Phe
1				5					10					15	

Asp	Tyr	Trp
-----	-----	-----

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 66

Cys Ala Lys Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Ser Leu Arg  
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu His Pro Trp  
20

<210> 67  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 67

Cys Ala Arg Asp Ser Phe Cys Ser Gly Gly Lys Cys Tyr Ser Tyr Gly  
1 5 10 15

[0021]

Met Asp Val Trp  
20

<210> 68  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 68

Cys Ala Arg Met Thr Tyr Ser Gly Ser Trp Arg Ser Tyr Trp Tyr Phe  
1 5 10 15

Asp Leu Trp

<210> 69  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列  
  
 <400> 69  
  
 Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Gly Asn Ser Met Asp Ala Phe His Ile Trp  
 1 5 10 15

<210> 70  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列  
  
 <400> 70

Cys Ala Arg Ala Arg Lys Thr Leu Asn Met Leu Val Val Val Ile Thr  
 1 5 10 15

Ser Ala Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 20 25

[0022]

<210> 71  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列  
  
 <400> 71

Cys Ala Arg Leu Arg Ala Val Val Thr Pro Asp Trp Ser Ser Glu Ala  
 1 5 10 15

Phe Phe Asp Leu Trp  
 20

<210> 72  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR3肽序列

<400> 72

Cys Ala Arg Arg Ser Ser Arg Cys Gln Tyr Pro Phe Cys Tyr Tyr Tyr  
1 5 10 15

Gly Met Asp Val Trp  
20

<210> 73

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 73

Cys Ala Arg Asp Gly Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr His Gly Ile  
1 5 10 15

Gln Val Ala Pro Thr Asn Trp Phe Asp Pro Trp  
20 25

[0023]

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 74

Cys Ala Arg Ser Ser Leu Asn Gly Asp Gln Ser Tyr Phe Asp Ser Trp  
1 5 10 15

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

<223> CDR3肽序列

<400> 75

Cys Ala Arg Glu Val Ile Arg Gly His Tyr Ser Asp Tyr Thr Leu Gln  
1 5 10 15



Gly Ile Phe Asp Pro Trp  
20

<210> 76  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> DOMAIN  
<223> CDR3肽序列

<400> 76

Cys Ala Arg Leu Arg Thr Phe Met Ala Ala Thr Asn Thr Pro Asp Ala  
1 5 10 15

Phe Asp Phe Trp  
20

<210> 77  
<211> 1458  
<212> DNA  
<213> Artificial

[0024]

<220>  
<221> CDS  
<223> 重链基因序列

<400> 77

```

gcggccgcaa actacaagac agacttgcaa aagaaggcat gcacagctca gcaactgctct      60
gttgccctggt cctcctgact ggggtgaggg cccaggtgca gctggtgcag agcggcgccg      120
aggtgaaaaa gcccggcgcc tcagtgaaag tgagctgcaa ggtgagcggc ttcaccgtga      180
gcgagctgag catctactgg gtgagacaga gccccgaaa aggctggag tggatgggaa      240
acatcgacgc tgtgtatggg gagacaacct acgctcagaa gttcgagggc agactgacct      300
tgaccgagga caccagcacc gagacagcct acatggagct gagaagcctg acccagcgaag      360
atactgctat ctactattgc gccaccgact cccccgccc cattgtggtg tacgcctttg      420
ccatgtgggg ccagggcacc atggtgaccg tgagctccgc tagcaccaag ggcccatcgg      480
tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc      540
tggtcaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc gccctgacca      600
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtctcagg actctactcc ctcagcagcg      660
    
```

```

tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca 720
agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca 780
catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc 840
caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccccga ggtcacatgc gtggtggtgg 900
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc 960
ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg 1020
tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca 1080
acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag 1140
aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc 1200
tgacctgctt ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg 1260
ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct 1320
tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 1380
gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc 1440
cgggtaaatag attctaga 1458
    
```

[0025]

```

<210> 78
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> DOMAIN
<223> 重链氨基酸序列
    
```

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Thr Val Ser Glu Leu  
 20 25 30

Ser Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asn Ile Asp Ala Val Tyr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Glu Gly Arg Leu Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Glu Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Thr Asp Ser Pro Arg Pro Ile Val Val Tyr Ala Phe Ala Met Trp	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	145	150	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	165	170	175
[0026] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn	195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser	210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	225	230	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	290	295	300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

[0027]

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

- <210> 79
- <211> 744
- <212> DNA
- <213> Artificial

- <220>
- <221> CDS
- <223> 轻链基因序列

<400> 79  
 gcggccgcaa actacaagac agacttgcaa aagaaggcat gcacagctca gcaactgctct 60  
 gttgcctggt cctctgaact ggggtgaggg ccgagattgt gatgacacag agccccgcca 120  
 cactgagcgt gagccccgga gaaagagcca cactgtcctg tagagccage cagagcgtga 180

gcagcaacct ggctggtat cagcagaggc ctgggcaggc cccagactg ctgatttacg 240  
 ggcctctgc cagagccacc ggggtgctg gacgcatcag cggaagcggc agcggcacag 300  
 agttcacct gaccatctcc tcaactgcaga gcgaggactg cgccgtgtac tactgccagc 360  
 agtacaatga ctggcccaga acctttggac agggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg 420  
 tggetgcacc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg 480  
 cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg 540  
 tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg 600  
 acagcaccta cagcctcagc agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaacacaca 660  
 aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagttc gcccgtcaca aagagcttca 720  
 acaggggaga gtgttgattc taga 744

<210> 80  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

[0028] <220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> 轻链氨基酸序列

<400> 80

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ala Arg Ala Thr Gly Val Pro Gly Arg Ile Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Cys Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Arg  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

[0029] Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 81  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR-H1

<400> 81

Glu Leu Ser Ile Tyr  
1 5

<210> 82  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR-H2

<400> 82

Asn Ile Asp Ala Val Tyr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Glu  
 1 5 10 15

Gly

<210> 83  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR-H3

<400> 83

Asp Ser Pro Arg Pro Ile Val Val Tyr Ala Phe Ala Met  
 1 5 10

<210> 84  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

[0030]

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR-L1

<400> 84

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala  
 1 5 10

<210> 85  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <223> CDR-L2

<400> 85

Gly Ala Ser Ala Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 86  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMAIN

[0031] <223> CDR-L3

<400> 86

Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Arg Thr  
1 5



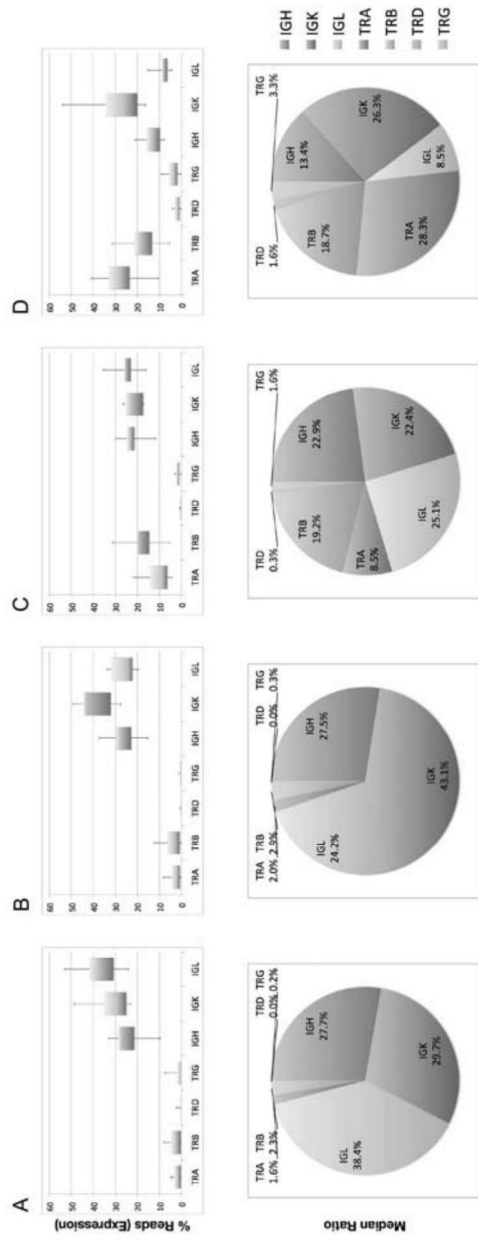


图1

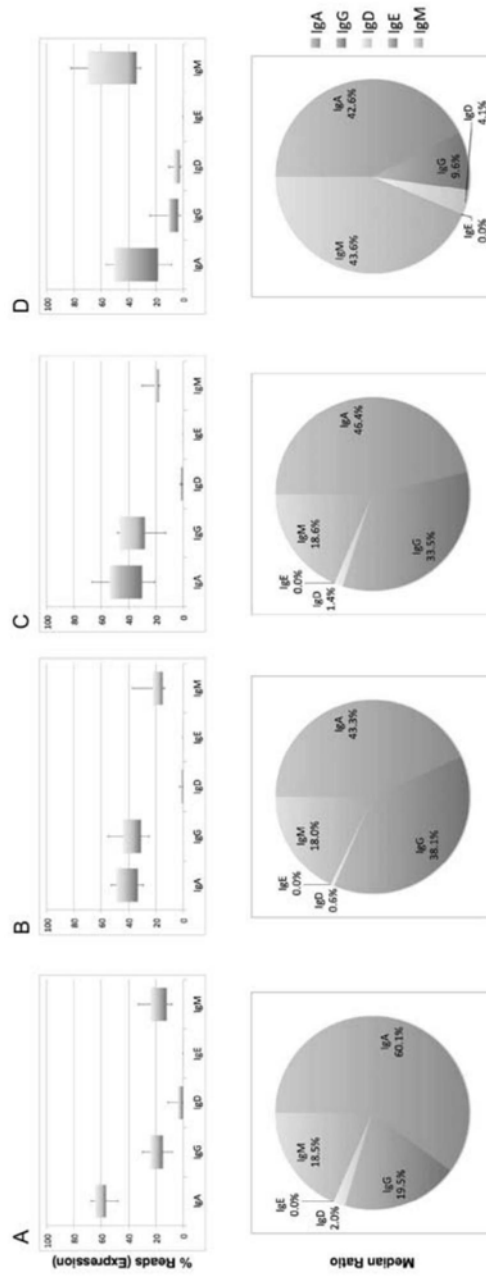


图2

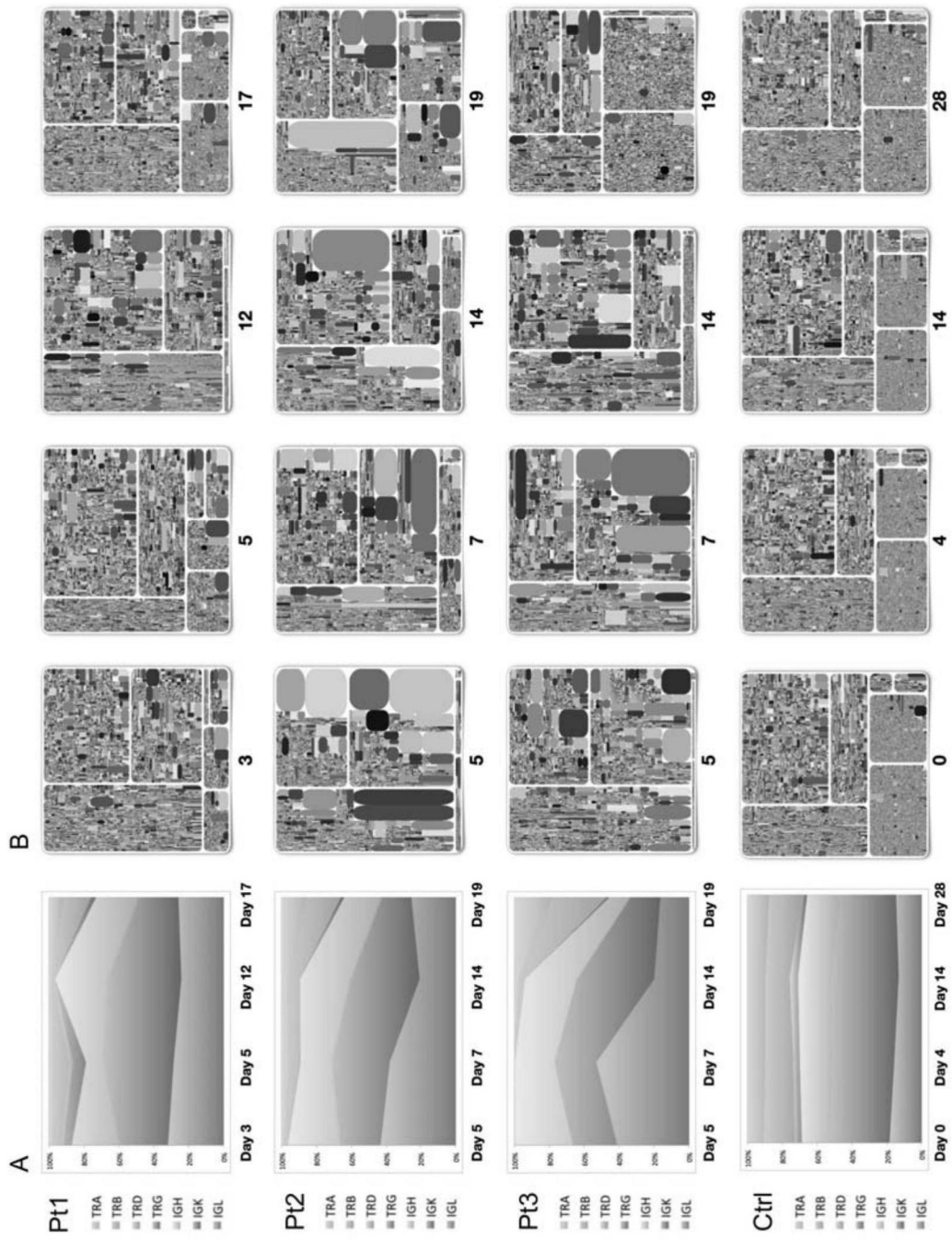


图3

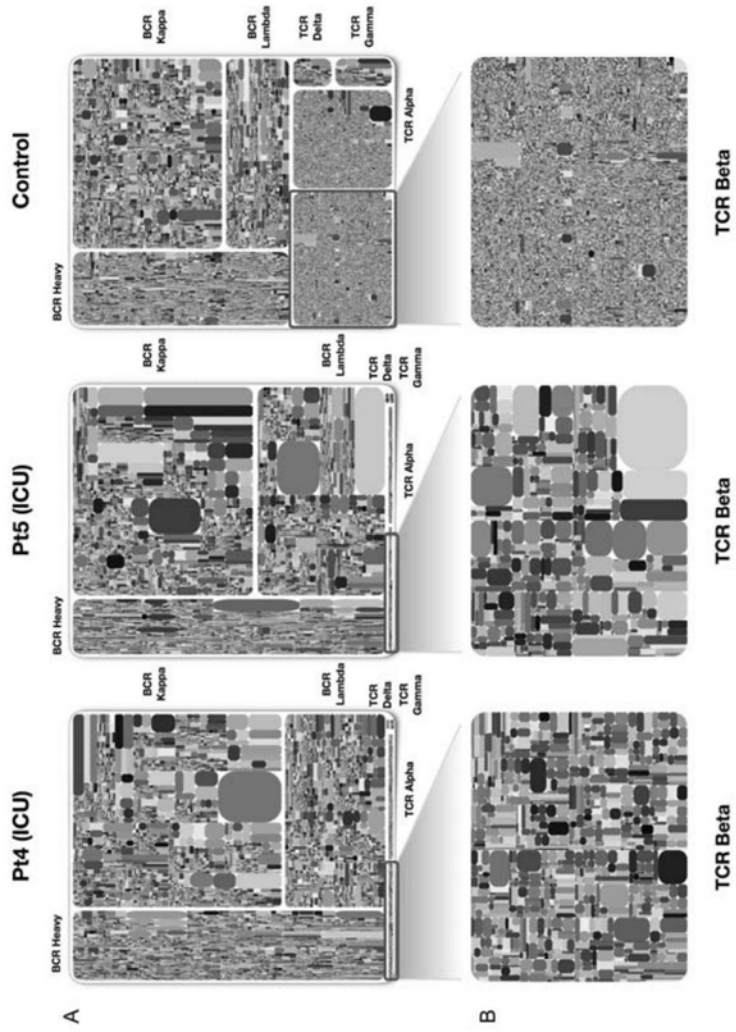


图4

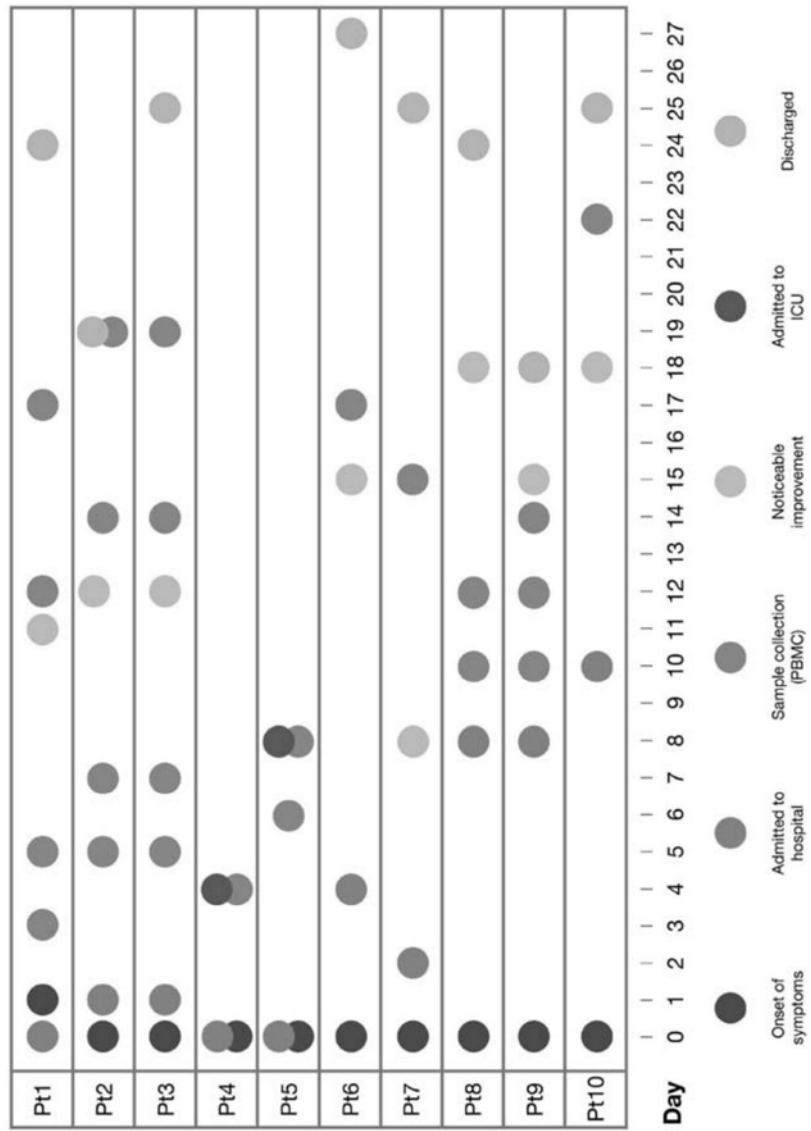


图5

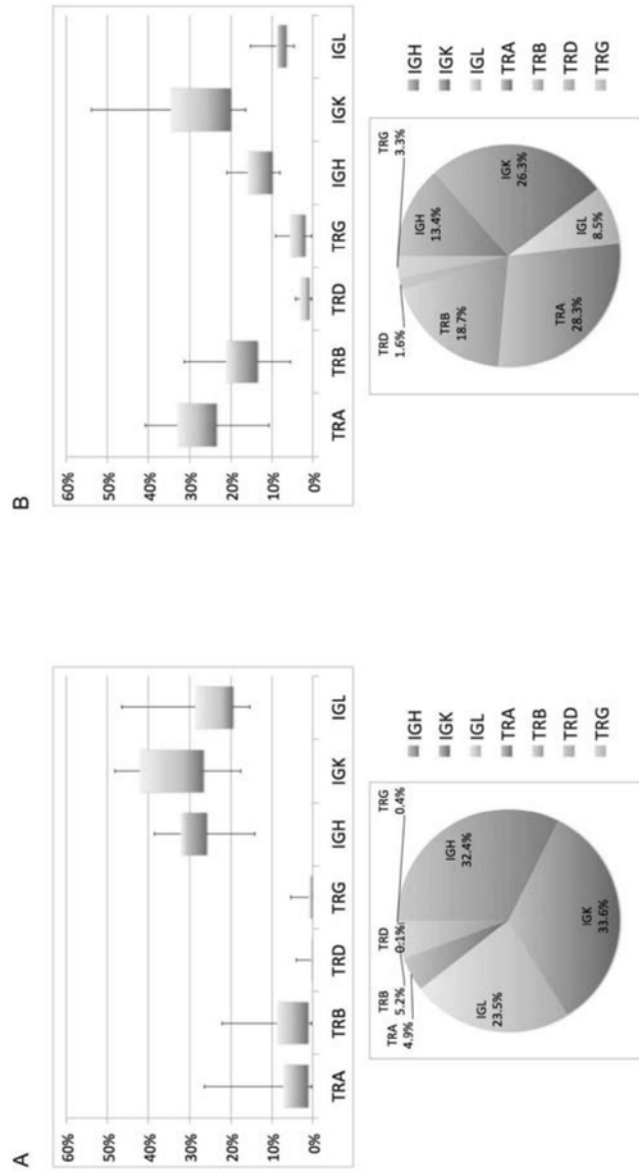


图6

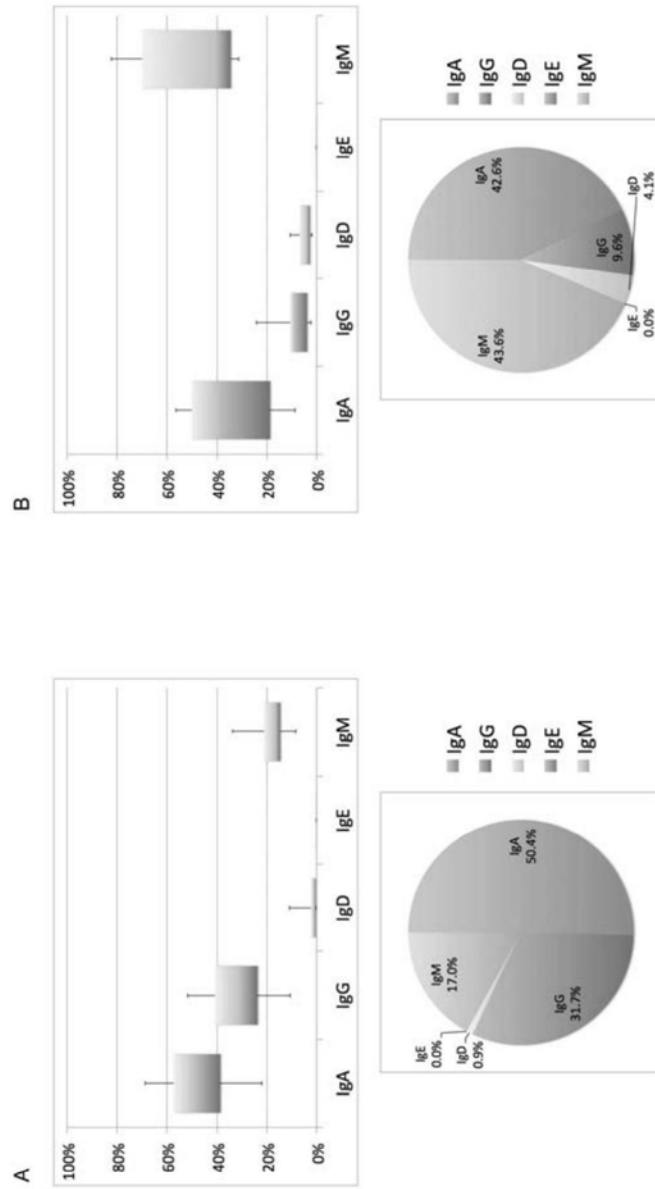


图7